

CT/JP 99/03682

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

08.07.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 8月27日

REC'D 27 AUG 1999

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第241367号

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

扶桑薬品工業株式会社

09/763836

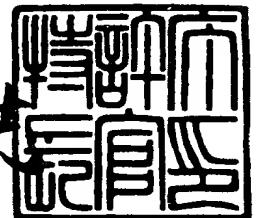
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3053220

【書類名】 特許願

【整理番号】 980827P-01

【提出日】 平成10年 8月27日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 15/09
C07H 21/00
C12N 5/10
C12P 21/00

【発明の名称】 遺伝子発現を増強する核酸配列および方法

【請求項の数】 21

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 山田 修

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 吉田 洋

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市城東区森之宮2丁目3番30号 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター内

 【氏名】 張 菁

【特許出願人】

 【識別番号】 000238201

 【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100065868

 【弁理士】

【氏名又は名称】 角田 嘉宏

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100088960

【弁理士】

【氏名又は名称】 高石 ▲さとり▼

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100106242

【弁理士】

【氏名又は名称】 古川 安航

【電話番号】 078-321-8822

【選任した代理人】

【識別番号】 100107940

【弁理士】

【氏名又は名称】 岡 憲吾

【電話番号】 078-321-8822

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006220

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705390

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子発現を増強する核酸配列および方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 有用遺伝子の発現増強のために、遺伝子発現ベクターに組み込まれる核酸配列であって、

ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域もしくはその断片またはその変異体が有する核酸配列を含む核酸配列。

【請求項 2】 前記5' 非翻訳領域が、少なくとも1つのピリミジンリッチ領域を含む請求項 1 記載の核酸配列。

【請求項 3】 前記5' 非翻訳領域が、AUGまたはATGの配列をさらに含む請求項 2 記載の核酸配列。

【請求項 4】 前記5' 非翻訳領域が、ウイルスのmRNAのIRES領域の一部または全体を含む請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 5】 前記核酸配列が、ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部またはその変異体をさらに含む請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 6】 前記核酸配列が、遺伝子発現ベクターにおいて発現制御プロモーター配列の下流、且つ有用遺伝子の配列の上流に組み込まれる請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 7】 前記核酸配列がcDNA配列である請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 8】 前記遺伝子発現ベクターが、真核細胞における発現用ベクターである請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 9】 前記ウイルスが、RNAウイルスである請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の核酸配列。

【請求項 10】 前記ウイルスが、HCVウイルスである請求項 9 記載の核酸配列。

【請求項 11】 前記ウイルスがHCVウイルスであり、前記核酸配列が、HCVウイルスのコア蛋白質翻訳領域の一部またはその変異体をさらに含む請求項 10

記載の核酸配列。

【請求項 12】 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、
 gccagcccc tgatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 (配列番号：1、ヌクレオチド第1～180位) からなる請求項 10 記載の核酸配列

【請求項 13】 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、
 gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 60
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 120
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 161
 (配列番号：1、ヌクレオチド第181～341位) からなる請求項 10 記載の核酸配列。

【請求項 14】 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、
 gccagcccc tgatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
 tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
 cccccctccc gggagagcca tagtggtctg cggaaccggt gagtacaccg gaattgccag 180
 gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 300
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c 341
 (配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位) からなる請求項 10 記載の核酸配列

【請求項 15】 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、
 gacgaccggg tcctttcttg gatcaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 60
 gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtggtact gcctgatagg 120
 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 180
 ctcaaagaaa aaccaaact aacaccaacc gccgccaca ggacgtcaag tccccggcg 240
 gtggtcagat cgttggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 300
 gcgcgactag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca 360

aggctcgccg gcccgagggc aggacctggg ctacgcccgg gtatccttgg cccctctatg 420
gcaacgaggg catgggggtgg gcaggatggc tcctgtcgcc ccgcggctcc cggcctagtt 480
ggggcccttc ggaccccccg cgtaggtcgc gtaatttggg taaggtcatc gat 533

(配列番号：1、ヌクレオチド第181～713位) からなる請求項1記載の核酸配列。

【請求項16】 前記核酸配列が、以下のヌクレオチド配列すなわち、

gccagcccc tgatgggggc gacactccac catagatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggt gactacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgc ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcaca aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaact aacaccaacc gccgccaca ggacgtcaag tccccgggcg 420
gtggtcagat cgttggtgga gtttacctgt tgccgcgcag gggccccagg ttgggtgtgc 480
gcgcgactag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgtgg aaggcgacaa cctatcccca 540
aggctcgccg gcccgagggc aggacctggg ctacgcccgg gtatccttgg cccctctatg 600
gcaacgaggg catgggggtgg gcaggatggc tcctgtcgcc ccgcggctcc cggcctagtt 660
ggggcccttc ggaccccccg cgtaggtcgc gtaatttggg taaggtcatc gat 713

(配列番号：1) からなる請求項1記載の核酸配列。

【請求項17】 請求項1乃至16のいずれかに記載の核酸配列を含む遺伝子発現用ベクター。

【請求項18】 請求項17記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項19】 請求項17記載のベクターを用いて有用遺伝子産物を発現させる方法。

【請求項20】 請求項18記載の宿主細胞を培地中で生育させ、該細胞及び／または生育培地から有用遺伝子産物を単離する工程を含む、有用遺伝子産物の製造方法。

【請求項 21】 請求項 18 記載のベクターを用いて、有用遺伝子の発現を増強する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子発現用のベクターにおいて、有用遺伝子の発現を増強することができる核酸配列、当該核酸配列を含むベクター、当該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、ならびに当該ベクターを用いた有用遺伝子産物の製造方法、および有用遺伝子の発現を当該ベクターを用いて増強させる方法に関する。さらに詳細には、in vivoおよびin vitroでの遺伝子産物の生産量を増加させることができ、従って種々の実験用途の他に、臓器や腫瘍などに特異的であるがその活性が弱いために実用化が難しかったプロモーターと組み合わせることによって効果的な遺伝子治療にも応用することができる、有用遺伝子発現増強核酸配列に関する。

【0002】

【従来の技術】

mRNAの翻訳開始機構には、キャップ依存的機構とキャップ非依存的機構が存在することが知られている。原核細胞系mRNAの5'末端構造はpppNであるが、真核細胞のmRNAは5'末端にキャップ構造((7-MeG)-5'-ppp-5'-(G/A)-3'-p-) (G、Aのリボース部分はメチル化されることもある)を有している。このキャップ構造は核から細胞質へのmRNAの輸送過程に寄与し、mRNAをRNaseから保護する役割を有している。真核細胞の細胞質では、キャップ結合蛋白質複合体eIF4F(Eukaryotic initiation factor: eIF)のキャップ構造への結合により、リボソームの40SサブユニットのmRNA 5'末端へのエントリーが促進され、mRNAの5'末端にエントリーしたリボソームは、100塩基前後と短い5'非翻訳領域をスキッピングして、mRNA上を3'方向に移動し、多くの場合、最初に出会うAUG配列を開始コドンとしてペプチド合成が行われる。

【0003】

しかしながら、以上のようなキャップ依存的翻訳開始機構とは異なる真核細胞

系mRNAの存在が確認された。真核細胞系mRNAの5'末端にキャップ構造の存在が明らかにされていたが、ポリオウイルス (poliovirus) mRNAの5'末端はキャップ構造ではなく、単なるpUであることが報告された (Nomoto, A. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5345, 1977)。その後、ポリオウイルスRNAの全一次構造が解明され、詳細な遺伝子地図も明らかとなった (Kitamura, N. et al. ; Nature, 291, 547, 1981)。その結果、開始コドンAUGはmRNAの743番目の塩基に位置しており、その上流に多くのAUG配列が存在していることが判明した。このようなmRNAの構造は、ポリオウイルスの仲間のウイルス (ピコルナウイルス科のウイルス) に共通であることも明らかにされた。さらに、ポリオウイルス (Pelletier, J. et al. ; Nature, 334, 320, 1988) と脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus ; EMCV) (Jang, S. K. et al. ; J. Virol., 62, 2636, 1988) のRNAを使用した実験により、キャップ非依存的翻訳開始機構 (内部開始モード) の存在が証明され、リボソームはmRNAの5'非翻訳領域 (5'-untranslated region ; 5'-UTR) 内に存在する塩基配列を認識し、エントリーすることが判明した。リボソームのエントリーに必要な領域は、IRES (internal ribosomal entry site (内部リボソームエントリー部位)) と言われている。

【0004】

ピコルナウイルスRNAの5'-非翻訳領域は約600~1200塩基であり、この領域の中の約450塩基がIRES活性を有している。これらピコルナウイルスIRES中には共通構造が存在し、ピリミジンリッチ領域 ((C/U)x) とそれに続くAUGを含む約7塩基の配列がある。両者の間には10~20塩基のランダムな塩基配列 (Ny) が介在している (Jang, S. K. et al. ; in Translationally Regulated Genes in Higher Eukaryotes, Thach, R. E. ed., 292-309, Karger, 1990)。ピリミジンリッチ領域とは、ピリミジン塩基が連続して少なくとも4~5以上存在している領域をいう。かかる(C/U)x-Ny-AUGのユニットがIRESにとって必要な構造の一つであることが考えられ、実際にAUGを含む塩基配列を欠損させるとIRES活性は低下し、さらに(C/U)x全域の欠損によりIRES活性が消失することが知られている (Kuge, S. et al. ; J. Virol., 61, 1478, 1987, Iizuka, N. et al. ; J. Virol., 65, 4867, 1991)。一般に、(C/U)xの配列の領域をBoxA、AUGを含む約7塩基の配

列の領域をBoxBと言う。両Boxは、18SリボソームRNA (rRNA) の3'末端と相補性を示すため、IRESは原核生物系mRNAのシャイン・ダルガーノ配列 (SD配列) と類似した機能を有するものであると考えられる (Pilipenko, E. V. et al. ; Cell, 68, 119, 1992)。

【0005】

ピコルナウイルスIRESは、その構造上の特徴により2つの型に分類されており、エンテロウイルス (enterovirus) とラノウイルスのIRESを1型、カルジオウイルス (cardiovirus) とアフトウイルス (aphthovirus) のIRESを2型と分類している。また、ヘパトウイルス (hepatovirus) のIRESは2型に類似していると考えられている。

【0006】

1型IRESの場合、リボソームは(C/U)x-Ny-AUGユニット下流をスキッピングし、最初に出会うAUGを開始コドンとしてペプチド合成を開始する。実際に、開始コドンAUGの前にAUG配列を挿入すると、ウイルス複製は著しく阻害される (Kuge, S. et al. ; J. Virol., 63, 1069, 1989, Kuge, S. et al. ; J. Mol. Biol., 207, 175, 1989)。2型のIRESの場合には、(C/U)x-Ny-AUGユニット内のAUGが開始コドンとして使われている。

【0007】

1989年、輸血後非A非B型肝炎の病原体として、プラス一本鎖RNAウイルスであるC型肝炎ウイルス (以下HCV) が報告された (Choo, Q. et al. ; Science, 244, 359, 1989)。臨床においては慢性感染を経て高率に発生する肝硬変・肝細胞癌 (Saito, I. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6547, 1990) が問題となっている。現在までに、少なくとも40株のHCVゲノムの全塩基配列が決定された。全長約9600塩基のゲノムRNAは、341塩基前後の5' 非翻訳領域、3008~3037アミノ酸残基のポリペプチドをコードする翻訳領域、200~300塩基の3' 非翻訳領域より成り、3' 非翻訳領域はポリU/C配列の後、98塩基の3' Xと呼ばれる構造で終わる。ポリペプチドはフラビウイルスもしくはペスチウイルスに類似しており (Kato, N. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524, 1990, Takamizawa, A. et al. ; J. Virol., 65, 1105, 1991) ウイルス蛋白質にはN末からC/co

re, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5Aと名付けられている。E2に相当する領域は、フラビウイルス属では非構造蛋白質NS1、ペスチウイルス属ではエンベロープ蛋白質E2である。HCVはかつてE2/NS1と呼ばれたが、ペスチウイルス属に近い性質を示し、エンベロープ蛋白質であると予想されるようになったため、最近では単にE2と言う。塩基配列の相同性からウイルスの遺伝子型には少なくとも6個、最大で11個の遺伝子型が存在することが報告されている。

【0008】

ウイルス分類学上、HCVは後に同定されたGBウイルス／G型肝炎ウイルスとともにフラビウイルス科の独立した一属に分類される。HCVの塩基配列中、5'末端非翻訳領域には、通常真核細胞が行っているmRNAからのキャップ依存性の蛋白質への翻訳とは異なった、ピコナウイルスなどに認められる内部翻訳開始領域IRESが存在することが発見されている (Tsukiyama-Kohara, K. et al. ; J. Virol., 66, 1476, 1992)。このIRESはピコルナウイルスIRESより短い塩基配列で活性を示し、両者全く異なる二次構造が予想されている (Tsukiyama-Kohara, K. et al. ; J. Virol., 66, 1476, 1992、Brown, E. A. et al. ; Nucl. Acid Res., 20, 5041, 1992)。一方このHCVのIRES領域にも、18S rRNAの3'末端に相補的なBox AおよびBox Bに相当する塩基配列が観察されている (Nomoto, A. et al. ; in Viral Hepatitis and Liver Disease, Nishioka, K., Suzuki, H., Mishiri, S., Oda, T. eds., 118, Springer-Verlag, 1994)。HCVのIRES領域の推定構造については、図1を参照されたい。図中、前記Box Aに相当するピリミジンリッチ領域および前記Box Bに相当する、AUGを含む約7塩基の配列を太線で示し、Box Aの上流に存在するピリミジンリッチ領域を二重線で示し、トランス因子(後述)の結合部位に囲みを付した。

【0009】

しかしながら、最近、IRES活性が同定されたペスチウイルス (pestivirus、フラビウイルス科) のIRESには、二次構造こそHCVのIRESに似ているものの (Brown, E. A. et al. ; Nucl. Acid Res., 20, 5041, 1992)、Box AおよびBox Bに相当する塩基配列は存在しない。最近次々に発見されている植物ウイルスのIRESは、さらに短い塩基配列で活性を示し、Box AやBox Bに相当する塩基配列は保持されて

いない。これらの結果から、両BoxはIRES活性にとって必ずしも必須でないことが示される。IRESの機能発現様式は様々であり、キャップ依存的翻訳開始機構のような画一的な機構では説明しきれない可能性がある。

【0010】

HCVでは、翻訳の開始は5'部位に存在するIRESに依存する点で、通常の実核細胞mRNAに見られるキャップ依存性の蛋白質合成における翻訳開始と異なっている。IRES依存性に合成される一本の長いポリペプチドは、宿主シグナルペプチダーゼと2種のウイルスプロテアーゼによるプロセッシングを受けて上述の個々の蛋白質となる。これらの蛋白質はシグナルペプチダーゼによるプロセッシング、糖鎖の付加、ウイルス蛋白質によるリン酸化など、さらに個別にプロセッシングを受けてウイルス複製や感染成立に必要な様々な機能を獲得して行く。

【0011】

HCVの約341塩基と長い5'非翻訳領域は、開始コドンとならないAUG配列を複数(2~5個)持ち、複雑な二次構造を形成しうる点でフラビウイルス属よりはベスチウイルス属もしくはピコナウイルス科のウイルスに類似している(Han, J. H. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1711, 1991, Brown, E. A. et al. ; Nucleic Acid. Res., 20, 5041, 1992)。

【0012】

現在までに様々な研究者によってHCVのIRES領域についての報告がなされているが、その内容は研究者によって差異が認められる。これは、実験で用いられたRNAの構造や、翻訳系が影響したためであると考えられる。ウサギ網状赤血球抽出液、もしくはワクシニアウイルスによりT7RNAポリメラーゼを共発現させる培養細胞へのDNAトランスフェクションにより、5'非翻訳領域の40塩基前後から翻訳領域の30塩基前後までをIRES領域とする考え方がある(Reynolds, J. E. et al. ; EMBO J., 14, 6010, 1995)。また、培養細胞に対してRNAトランスフェクションを行い、5'境界は28塩基から45塩基の間にあることも証明されている(Kamoshita, N. et al. ; Virology, 233, 10, 1997)。さらに、無細胞系での解析によると、3'境界は翻訳領域の数十塩基ではなく、370塩基から516塩基の間にあるという結果も得られている。これはコア蛋白質(5'非翻訳領域直下の翻訳領域

の配列によりコードされる蛋白質)のN末端側3分の2がIRES活性を上昇させる報告(Lu, H. -H. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1412, 1996)を支持する結果であるが、この領域がRNAの構造として重要である可能性も否定できない。

【0013】

IRESの機能発現には、キャップ依存的翻訳開始に関わる分子群の多くが動員されるが、その他の宿主細胞側分子群(トランス因子)も必要であるとされる(Scheper, G. C. et al. ; J. Biol. Chem., 267, 7269, 1992)。このことは、IRES機能発現が種および組織・細胞特異的であることから容易に想像できる。

【0014】

キャップ構造を持つmRNAの無細胞蛋白質合成系として知られる麦芽抽出液、ウサギ網状赤血球の抽出液(RRL)、およびHeLa細胞抽出液を使用した各ウイルスIRES活性の比較実験によれば、麦芽抽出液では、ピコルナウイルスIRESは報告された限り活性を示さない。一方、RRL中ではEMCVのIRESは高い活性を示すが、ポリオウイルスIRESの活性は微弱であり、HeLa細胞抽出液を加えることによりRRLでのポリオウイルスIRESの活性は回復することが報告されている(Brown, B. A. et al. ; Virology, 97, 396, 1979, Dorner, A. J. et al. ; J. Virol., 50, 507, 1984)。また、HeLa細胞抽出液中ではこれらウイルスのIRESはいずれも高い活性を示し、A型肝炎ウイルス(HAV)のIRES活性のみがHeLa細胞抽出液中でも低いという結果も得られている(Glass, M. J. et al. ; Virology, 193, 1047, 1993)。これらのことから、キャップ構造をもつmRNAが利用する、開始因子以外の宿主細胞分子群がIRESの機能発現には必要であることは明らかである。また、IRES毎にその機能発現に要求される分子群には質的・量的な違いがあることも明らかである。

【0015】

さらに、いずれのIRESへも多くの宿主細胞側分子が結合することが、UVクロスリンキング法(UV照射により、核酸とそれに結合している蛋白質を共有結合させ、結合蛋白質を検出する方法)による解析によって示されている。そして翻訳の開始には、RNAの高次構造の他に、IRES特異的に作用するトランス因子が重要な

役割を果たしていることが明らかになってきている。すなわち、ピコルナウイルス IRES の活性を促進する宿主分子としては、現在までのところ、2種類の IERS 結合蛋白質である La (52kDa)、PTB (polypyrimidine tract binding protein, 57 kDa) が知られている (Meerovitch, K. et al. ; J. Virol., 67, 3798, 1993、Hellen, C. V. T. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7642, 1993、Borman, A. et al. ; J. Gen. Virol. 74, 1775, 1993)。La は自己免疫疾患の抗原蛋白質として知られており、また、RNA ポリメラーゼ III による転写の終結因子である。そして PTB は、RNA スプライシング因子のコファクターである。これらは核に局在している蛋白質であり、実際に核内の反応に関与している。しかしながら、例えば、ポリオウイルスの感染により、La は核から細胞質へと移行することが報告されており (Meerovitch, K. et al. ; J. Virol., 67, 3798, 1993)、これらが細胞質での反応である翻訳の開始に関与しているという報告もある。

【0016】

各種 IRES に対する、PTB および La 要求性が種々検討されており、現在のところピコルナウイルス IRES の PTB 要求性は強いが、HCV IRES では PTB 要求性が非常に弱いことを示唆する結果 (Kaminski, A. et al. ; RNA, 1, 924, 1995)、および HCV の La の要求量はポリオウイルスほど多くないという結果も得られている。これとは異なり、HCV について PTB は 3箇所 で結合し、IRES 機能に必要であり (Ali, N. et al. ; J. Virol., 69, 6367, 1995)、La は開始 AUG を含む RNA 構造を認識して活性化する (Ali, N. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 2249, 1997) という報告もある。この種の実験は、PTB を極力除いた無細胞蛋白質合成系を使用して行われており、PTB 除去には特異的抗体や PTB に結合性を持つ RNA 断片が使用されている。したがって、PTB が他の分子と複合体を形成している場合には (Toyoda, H. et al. ; Arch. Virol., 138, 1, 1994)、複合体そのものが除かれている可能性がある。さらに、PTB の多くはリボソームに結合していることが知られているので、リボソームまで除去されている可能性も考慮しなければならない。ゆえに、IRES のトランス因子要求性に関するさらなる研究が必要であるが、IRES が必要とするトランス因子は IRES 毎に異なり、機能発現に至る機構も IRES によって様々である事が予想される。新しい IRES 関連因子が HCV に存在する可能

性はある、実際に、p25という5'非翻訳領域中の2次構造を認識し、結合性が翻訳活性との相関を示すHeLa細胞中の蛋白質が報告されている (Fukushi, S. et al. ; J. Virol., 71, 1662, 1997)。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

これまでに、遺伝子操作技術を用いて様々な蛋白質またはペプチド類が産生されている。例えばインスリン、各種インターフェロン、エリスロポエチン、マンナン結合蛋白質、コングルチニン、ニューロシン等、多くの物質が大腸菌をはじめとする微生物細胞およびCHO細胞等の動物細胞で産生されている。

【0018】

動物由来の有用遺伝子産物を遺伝子工学的に製造する場合、大腸菌、枯草菌、酵母等の微生物細胞宿主を用いると遺伝子が発現しなかったり、遺伝子産物である蛋白質が正しい立体構造をとらない、翻訳後修飾が正しくされない等の理由で活性を持たなかったりすることがしばしば起こる。その問題の解決のために動物細胞が宿主として用いられることが多い。動物細胞を用いると微生物細胞に比べて上記のようなメリットが得られる可能性があるものの、培養操作が煩雑になり、また逆に遺伝子の発現量が少なくなる可能性もある。

【0019】

このような細胞において遺伝子発現を行うためのベクターの開発は、多くの分子生物学的研究の基礎となる重要な課題である。かかるベクターには、目的に応じて効率的な大量発現や誘導可能な一過性発現等を行えることが要求される。その様な要求を満たすための、これらの発現系における従来の発現ベクター構築概念はプロモーターやエンハンサーの生来の機能に依存するものであった。すなわち、目的とする遺伝子産物の生産効率を上げる手段としては、天然の遺伝子から強力なプロモーターまたはエンハンサーを選択し、目的の蛋白質やペプチド類をコードするDNA配列に連結することによりmRNAの転写効率を上昇させることがもっぱら行われてきた。大量発現を効率的に行わせる場合には、SV40(Simian Virus 40)、SR α 、サイトメガロウイルスプロモーター、アクチンプロモーター、ウイルス性LTR(Long Terminal Repeat)、例えばHTLV-1 LTR、HIV-LTR、ラウス肉

芽種ウイルスLTR、単純ヘルペスチロシンキナーゼウイルスプロモーター等のプロモーターが強力なプロモーターとして知られており、これらを組み込んだ発現ベクターを主に哺乳動物細胞に対して使用することが行われている。また、エンハンサー配列をベクターに組み込むことにより遺伝子の転写効率を上昇させ、目的とする遺伝子産物の生産効率を上昇させることも行われている。

【0020】

一方、遺伝子産物を一過性に発現させる場合には、発現誘導物質を使用することが行われており、例えばマウス乳頭ガンウイルス (MMTV: Mouse Mamalian Tumour Virus) プロモーターを用いた発現系で、発現が望まれる際に発現誘導物質であるデキサメタゾンを添加する方法等も行われている。

【0021】

また、2種類の異なった蛋白質をコードしているcDNA(第1シストロンと第2シストロン)からの蛋白質発現を第1シストロンと第2シストロンの間にこの内部翻訳開始シグナルに相当する塩基配列を組み込むことにより、1個のプロモーターによって2種類の蛋白質を発現させることができることが報告されており (Ura be, M. et al. ; Gene, 200, 157, 1997)、また実際に応用されている。しかし、これら従来の手法によって得られる発現ベクターからは必ずしも十分な生産効率が達成されるわけではない。

【0022】

また、近年目覚ましく開発が進められてきている遺伝子治療法によって、従来の方法では困難であった疾病の治療が可能となり、この方法の広範なる適用が期待されているが、体内の特定部位において目的遺伝子を望ましい効率で発現させるためのベクター構築には、依然解決されるべき問題が残されている。すなわち、プロモーターが臓器や腫瘍などに特異的であっても、その活性が弱いために遺伝子発現の効率が低く、このようなプロモーターを組み込んだベクターを用いて遺伝子を導入したとしても治療効果が存分に得られない場合がある。

【0023】

このように、当該技術分野において、より発現効率の優れた発現ベクターの開発が望まれている。従って、本発明は、目的とする遺伝子産物の生産効率を上げ

るために、従来の発現ベクター構築概念にとらわれない新規な発現ベクターを提供することを目的とする。

【0024】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を行った結果、ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域もしくはその断片またはその変異体が有する核酸配列を遺伝子発現ベクターに組み込むことによって、目的の有用遺伝子の発現が増強されることを見出し、本発明を完成した。

【0025】

前記5' 非翻訳領域は、少なくとも1つのピリミジンリッチ領域を含むことが好ましく、AUGまたはATGの配列をさらに含むことが、より好ましい。係るAUGまたはATG配列は、開始コドンとして5' 非翻訳領域の最下流または翻訳領域の最上流等に組み込まれてもよい。

【0026】

また、前記5' 非翻訳領域は、ウイルスのmRNAのIRES領域の一部または全体を含むことが好ましい。該IRES領域は、IRES活性を有していても有していなくてもよいが、その由来となった領域がIRES活性を有していたものであることが好ましい。本発明の核酸配列を遺伝子発現ベクターに組み込んだ場合に、該IRES領域がIRES活性を有しているか否かは不明である。

【0027】

そして、前記核酸配列は、ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部またはその変異体をさらに含んでもよい。

【0028】

前記核酸配列が遺伝子発現ベクターに組み込まれる位置は、発現制御プロモーター配列の下流、且つ有用遺伝子の配列の上流であるとよい。

【0029】

遺伝子発現ベクターに組み込まれる前記核酸配列は、好ましくはcDNA配列である。

【0030】

前記遺伝子発現ベクターは、好ましくは真核細胞における発現用のベクターである。

【0031】

前記ウイルスとしては、RNAウイルス、特にHCVウイルスが好ましい。

【0032】

前記ウイルスがHCVウイルスであり、前記核酸配列が、HCVウイルスのコア蛋白質翻訳領域の一部をさらに含むものも本発明において好適である。

【0033】

遺伝子発現ベクターに組み入れられる前記核酸配列は、配列番号：1のヌクレオチド第1～180位、第181～341位、第1～341位、第181～713位もしくは第1～713位からなる核酸配列が現在のところ好ましいことが明らかになっている。

【0034】

本発明はまた、如上の遺伝子発現増強核酸配列を含む遺伝子発現用ベクター、当該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、当該ベクターを用いて有用遺伝子産物を発現、製造する方法、および当該ベクターを用いて有用遺伝子の発現を増強する方法を企図する。

【0035】

すなわち本発明者らは、ベクター内のプロモーター配列とルシフェラーゼ蛋白質をコードしているcDNA配列との間に、HCV遺伝子の5'非翻訳領域もしくはその断片、または5'非翻訳領域からコア領域の5'側の一部もしくはその断片が有する有用遺伝子発現増強核酸配列を組み込んで発現させることにより、かような核酸配列を組み込まない従来型のベクターを発現させた場合よりもルシフェラーゼの酵素活性が増大していることを見いだした。これは酵素蛋白質量の増加によるものと考えられることから、組み込んだ配列は有用遺伝子の発現増強効果を呈することが判明した。

【0036】

さらに、この効果は別のプロモーターや、起源の違うルシフェラーゼを用いた場合にも認められたことから、特殊なプロモーター配列-有用遺伝子発現増強核

酸配列-有用遺伝子配列の特定の組み合わせだけで起こるのではなく、比較的一般的に、発現プロモーターや目的遺伝子産物との組み合わせにより生じることが判明した。また、この有用遺伝子発現増強核酸配列の鎖長を変化させて、その効果を有する領域の特定を行った結果、HCV(HCV JTB株など)の遺伝子の5'側ヌクレオチド第181~341位に相当する部分が最も強い効果を有していることを見いだした。

【0037】

この効果は、単なる細胞培養系における蛋白質やペプチド類(例えばサイトカイン等)の産生量を in vitro で増加させる目的に利用され得るだけでなく、従来、臓器や腫瘍などに特異的であるがその活性が弱いために実用化が難しかったプロモーターと組み合わせることによって、in vivo でも効果的な遺伝子治療用ベクター等にも応用することができる。

【0038】

【発明の実施の形態】

本発明の有用遺伝子には、宿主において発現可能なペプチドをコードする核酸、細胞由来遺伝子のアンチセンス核酸、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする遺伝子もしくは転写調節因子の結合部位の配列またはこれらに類似の配列を有するデコイをコードする核酸、各細胞由来のmRNAを切断するリボザイム、自殺遺伝子等が挙げられる。この遺伝子は、好ましくはゲノムDNA、cDNA、または部分的もしくは全体的に化学合成されたDNA、特に好ましくはcDNAである。

【0039】

前記ペプチドは、オリゴペプチド、ポリペプチドおよび蛋白質を含み、遺伝子の転写、翻訳後に糖、脂質、リン酸、金属などによる修飾を受けたものも本発明におけるペプチドに含意される。例えば、インスリン、各種インターフェロン、エリスロポエチン、マンナン結合蛋白質、コングルチニン、ニューロシン等の有用なペプチドが包含されるが、これらに限定されることはない。

【0040】

前記アンチセンス核酸とは、複製、転写、翻訳等の遺伝子発現のある段階において、将来発現されうる核酸配列に対して特異的に結合する核酸もしくは核酸配

列を示し、結果として将来発現されうる核酸配列の発現を阻害するものである。アンチセンス核酸には三重鎖によるアンチジーン核酸も含まれる。

【0041】

また、前記のデコイをコードする核酸とは、細胞由来転写調節因子の結合蛋白質をコードする核酸もしくは転写調節因子の結合部位の配列またはこれらに類似の配列を有する核酸を示す。これらの核酸を、図として細胞内に導入することで、転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、転写調節因子の作用を抑制し、最終的には活性化される遺伝子群を抑制することができる可能性がある。

【0042】

前記リボザイムとは、特定の蛋白質のmRNAを切断するものをいい、これら特定の蛋白質の翻訳を阻害するものを言う。リボザイムは特定の蛋白質をコードする遺伝子配列より設計可能であり、例えば、ハンマーヘッド型リボザイム、ヘアピンリボザイム、デルタ型リボザイムなどのリボザイムの種類に関わらず、特定の蛋白質のmRNAを切断するもので、これら特定の蛋白質の翻訳を阻害するものであれば本明細書で言うリボザイムに含まれる。

【0043】

前記自殺遺伝子とは、アポトーシス誘発遺伝子（プログラム細胞死誘発遺伝子）、ネクローシス誘発遺伝子等を含み、その発現の結果細胞が死に導かれる遺伝子を言う。

【0044】

また、これら有用遺伝子を融合蛋白質として発現させることもできる。融合蛋白質とは、有用遺伝子より発現される蛋白質のN末端に他の蛋白質由来のN末端ペプチド鎖を付加したり、あるいはC末端に適当なペプチド鎖を付加して発現させた蛋白質である。

【0045】

次に、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を得るために利用することができる核酸の起源としては、遺伝子（好ましくはmRNA）の5'末端に非翻訳領域を有しているものであれば特に限定されない。また、mRNAの5'非翻訳領域中にIRES領域の一部または全体を有しているものが好ましい。

【0046】

以下、本発明で有用遺伝子発現増強のために用いられる核酸配列として使用可能な配列を有するウイルスにつき詳説する。

【0047】

ウイルスは粒子内にDNAまたはRNAのどちらか一方を遺伝子として有しており、大きくDNAウイルスおよびRNAウイルスとに分類される。

【0048】

DNAウイルスは、

- (1) 核で増殖する二本鎖DNAウイルス：例えば、パポバウイルス科 (Papovaviridae)、アデノウイルス科 (Adenoviridae)、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae)、
- (2) 細胞質で増殖する二本鎖DNAウイルス：例えば、ポックスウイルス科 (Poxviridae)、
- (3) 核で増殖する一本鎖DNAウイルス：例えば、パルボウイルス科 (Parvoviridae)、
- (4) イリドウイルス：例えば、イリドウイルス科 (Iridoviridae)、および
- (5) ヘパドナウイルス：例えば、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) に大きく分類されている。

【0049】

また、RNAウイルスは、

- (1) (+) 鎖一本鎖RNAウイルス：例えば、ピコルナウイルス科 (Picornaviridae)、トガウイルス科 (Togaviridae)、フラビウイルス科 (Flaviviridae)、カリシウイルス科 (Caliciviridae)、コロナウイルス科 (Coronaviridae)、
- (2) 非分節型 (-) 鎖一本鎖RNAウイルス：例えば、パラミキソウイルス科 (Paramyxoviridae)、ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)、フィロウイルス科 (Filoviridae)、
- (3) 分節型 (-) 鎖一本鎖RNAウイルス：例えば、オルトミキソウイルス科 (Orthomyxoviridae)、ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae)、アレナウイルス科 (Arenaviridae)、

- (4) 二本鎖RNAウイルス：例えば、レオウイルス科 (Reoviridae)、
- (5) アンピセンスRNAウイルス：例えば、アレナウイルス科 (Arenaviridae) およびブニヤウイルス科 (Bunyaviridae)、ならびに
- (6) レトロウイルス：例えば、レトロウイルス科 (Retroviridae) に大きく分類されている。

【0050】

以下に遺伝子中に5' 非翻訳領域を有する代表的DNAウイルスおよびRNAウイルスの科・属・種名を示すが、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列は、これらのウイルス由来のものから選択してもよいし、また、これらの変異体もしくは新種由来のものから選択してもよいし、さらにこれら以外の他のDNAウイルスもしくはRNAウイルス由来のものから選択してもよい。

【0051】

パポバウイルス科には代表的属としてパピローマウイルス (Papillomavirus) 属およびポリオーマウイルス (Polyoma virus) 属等があり、代表的種名として、ショープ乳頭腫ウイルス (Shope papilloma virus)、ポリオーマウイルス (Polyoma virus) および空胞形成ウイルス (Vacuolating virus) 等が挙げられる。

【0052】

アデノウイルス科には代表的属としてマストアデノウイルス (Mastadenovirus) 属およびアビアデノウイルス (Aviadenovirus) 属等があり、代表的種名として、ヒトアデノウイルス (Human adenovirus) およびセロウイルス (CELO virus) 等が挙げられる。

【0053】

ヘルペスウイルス科には代表的属としてアルファヘルペスウイルス (Alphaherpesvirus) 属、ベータヘルペスウイルス (Betaherpesvirus) 属、ガンマヘルペスウイルス (Gammaherpesvirus) 属等があり、代表的種名として、1型および2型単純疱疹ウイルス (Herpes simplex virus type 1, 2)、帯状水痘ウイルス (Varicella-zoster virus)、Bウイルス (B virus)、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus)、EBウイルス (EB virus)、HHV-6およびHHV-7等が挙げられる。

【0054】

ポックスウイルス科には代表的属としてオルトポックスウイルス (*Orthopoxvirus*) 属、アビポックスウイルス (*Avipoxvirus*) 属、カプリポックスウイルス (*Capripoxvirus*) 属、レポリポックスウイルス (*Leporipoxvirus*) 属、パラポックスウイルス (*Parapoxvirus*) 属、スイポックスウイルス (*Suipoxvirus*) 属、エントモポックスウイルス (*Entomopoxvirus*) 属、ヤタポックスウイルス (*Yatapoxvirus*) 属およびモルサイポックスウイルス (*Molluscipoxvirus*) 属等があり、代表的種名として、ワクシニアウイルス (*Vaccinia virus*)、鶏痘ウイルス (*Fowlpox virus*)、ヒツジ痘ウイルス (*Sheeppox virus*)、粘膜腫ウイルス (*Myxomavirus*)、羊驚口瘡ウイルス (*Orf virus*)、豚痘ウイルス (*Swinepox virus*)、昆虫痘ウイルス (*Insectpox viruses*)、ヤタウイルス (*Yata virus*) および伝染性軟属腫ウイルス (*Molluscum contagiosum virus*) 等が挙げられる。

【0055】

パルボウイルス科には代表的属としてパルボウイルス (*Parvovirus*) 属、ディペンドウイルス (*Dependovirus*) 属およびデンソウイルス (*Densovirus*) 属等があり、代表的種名として、パルボウイルスB19 (*Parvovirus B19*)、アデノ関連サテライトウイルス (*Adeno-associated satellite virus*) およびデンソヌクレオーシスウイルス (*Densonucleosis virus*) 等が挙げられる。

【0056】

イリドウイルス科には代表的属としてイリドウイルス (*Iridovirus*) 属等があり、代表的種名として、真珠光ウイルス (*Iridescent virus*) 等が挙げられる。

【0057】

ヘパドナウイルス科には代表的属としてヘパドナウイルス (*Hepadnavirus*) 属等があり、代表的種名として、B型肝炎ウイルス (*Hepatitis B virus*) 等が挙げられる。

【0058】

ピコルナウイルス科には代表的属としてエンテロウイルス (*Enterovirus*) 属、ヘパルナウイルス (*Heparnavirus*) 属およびライノウイルス (*Rhinovirus*) 属等があり、代表的種名として、1型および3型ポリオウイルス (*Poliovirus type*

1)、コクサッキーウイルスA群B群(6型以上)(Coxsackie virus)、A型肝炎ウイルス(Hepatitis A virus)、エコーウイルス(Echovirus)、1A型ヒトライノウイルス(Human rhinovirus type 1A)およびエンテロウイルス(Enterovirus)等が挙げられる。

【0059】

トガウイルス科には代表的属としてアルファウイルス(Alphavirus)属、ルビウイルス(Rubivirus)属およびペスチウイルス(Pestivirus)属等があり、代表的種名として、シンドビスウイルス(Sindbis virus)、風疹ウイルス(Rubella virus)、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス(Eastern equine encephalomyelitis virus)およびウシ粘膜病ウイルス(Mucosal disease virus of cattle)等が挙げられる。

【0060】

フラビウイルス科には代表的属としてフラビウイルス(Flavivirus)属およびヘパカウイルス(Hepacavirus)属等があり、代表的種名として、日本脳炎ウイルスB(Japanese B encephalitis virus)、黄熱病ウイルス(Yellow fever virus)およびC型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus)等が挙げられる。

【0061】

カリシウイルス科には代表的属としてカリシウイルス(Calicivirus)属およびヘペウイルス(Hepevirus)属等があり、代表的種名として、ノーウォークウイルス(Norwalk virus)およびE型肝炎ウイルス(Hepatitis E virus)等が挙げられる。

【0062】

コロナウイルス科には代表的属としてコロナウイルス(Coronavirus)属等があり、代表的種名として、ヒトコロナウイルス(Human coronavirus)、鳥類感染性気管支炎ウイルス(Avian infectious bronchitis virus)およびマウス肝炎ウイルス(Mouse hepatitis virus)等が挙げられる。

【0063】

パラミキソウイルス科には代表的属としてニューモウイルス(Pneumovirus)属、パラミキソウイルス(Paramyxovirus)属およびモービリウイルス(Morbill

ivirus) 属等があり、代表的種名として、呼吸性シンシチウムウイルス (Respiratory syncytial virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus) 麻疹ウイルス (Measles virus)、流行性耳下腺炎ウイルス (Mumps virus) およびパラインフルエンザウイルス (Para influenza virus) 等が挙げられる。

【0064】

ラブドウイルス科には代表的属としてベジクロウイルス (Vesiculovirus) 属およびリザウイルス (Lyssavirus) 属等があり、代表的種名として、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus) および狂犬病ウイルス (Rabies virus) 等が挙げられる。

【0065】

フィロウイルス属には代表的属としてフィロウイルス (Filovirus) 属等があり、代表的種名として、マルブルクウイルス (Marburg virus) およびエボラウイルス (Ebola virus) 等が挙げられる。

【0066】

オルトミキソウイルス科には代表的属としてインフルエンザウイルス (Influenzavirus) 属等があり、代表的種名として、A型、B型およびC型インフルエンザウイルス (Influenza virus type A, B and C) および豚インフルエンザ (Swine influenza) 等が挙げられる。

【0067】

ブニヤウイルス科には代表的属としてブニヤウイルス (Bunyavirus) 属等があり、代表的種名として、ブニヤヴェーラウイルス (Bunyawera virus)、ハンタウイルス (Hantaan virus) およびクリミア出血熱ウイルス (Crimean-Congo hemorrhagic virus) 等が挙げられる。

【0068】

アレナウイルス科には代表的属としてアレナウイルス (Arenavirus) 属等があり、代表的種名としてリンパ球脈路髄膜炎ウイルス (Lymphocytic choriomeningitis virus) およびラッサウイルス (Lassa virus) 等が挙げられる。

【0069】

レオウイルス科には代表的属としてオルビウイルス (Orbivirus) 属、レオウ

イルス (Reovirus) 属およびロタウイルス (Rotavirus) 属等があり、代表的種名としてブルータングウイルス (Bluetongue virus)、ヒトレオウイルス (Human reovirus) およびロタウイルス (Rotavirus) 等が挙げられる。

【0070】

レトロウイルス科には代表的亜科としてオンコウイルス (Oncovirinae) 亜科、スプマウイルス (Spumavirinae) 亜科およびレンチビウイルス (Lentivirinae) 亜科等があり、代表的種名として、ヒトT細胞白血病ウイルス (Human T cell leukemia virus) およびヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus) 等が挙げられる。

【0071】

有用遺伝子発現増強核酸配列としては、これらDNAウイルスおよびRNAウイルスを含む全てのウイルスの核酸配列中に存在する5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む核酸配列、またはその断片や、これらの変異体を使用することができる。5' 非翻訳領域とは、5' 末端に存在しアミノ酸に翻訳されない領域を称し、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列として使用するためには、IRES活性を有していても有していなくてもよいが、有しているのが好ましい。5' 非翻訳領域には、5'-UTR ; 5'-untranslated region または5-untranslated region、5'-NCR ; 5'-noncoding region、5'-NTR ; 5'-nontranslated region等が含まれる。

【0072】

如上のウイルスから有用遺伝子発現増強核酸配列を得るための方法を以下に述べる。核で増殖する二本鎖DNAウイルスは、dsDNA (二本鎖DNA) をゲノムとして有しているので、DNA依存性RNAポリメラーゼIIによってdsDNAからmRNAを合成し、その核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を調製する。また、細胞質で増殖する二本鎖DNAウイルスはdsDNAをゲノムとして有しており、ウイルス固有のDNA依存性RNAポリメラーゼによりmRNAを合成して、その核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を使用することができる。核で増殖する一本鎖DNAウイルスは、ssDNA (一本鎖DNA) をゲノムとして有

するので、DNAポリメラーゼによりdsDNAを合成し、その後DNA依存性RNAポリメラーゼIIによりmRNAを合成して、得られる核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を使用することができる。ヘパドナウイルスは、環状の部分的に二本鎖になったDNAをゲノムとして有しているので、ギャップを修復し、スーパーコイル型DNAに変換させ、変換後のDNAをDNA依存性RNAポリメラーゼIIによりmRNAを合成し、得られた核酸配列の5' 非翻訳領域もしくは非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列、またはその断片を使用することができる。

【0073】

次いでRNAウイルスから有用遺伝子発現増強核酸配列を得るための方法を以下に述べる。(+) 鎖RNAウイルスはmRNAをゲノムとして有しているので、該核酸配列の5' 非翻訳領域または5' 非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。非分節型および分節型を含む(-) 鎖RNAウイルスの場合は、ssRNA依存性RNAポリメラーゼ(レプリカーゼ)により相補的(+) 鎖RNAに変換し、該核酸配列の5' 非翻訳領域または5' 非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。二本鎖RNAウイルスは分節に分かれたdsRNAをゲノムとして有しており、dsRNA依存性ポリメラーゼによりmRNAを合成し、該核酸配列の非翻訳領域または非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。アンピセンスRNAウイルスは(+) 鎖および(-) 鎖の両方をゲノムとして有し、ssRNA依存性RNAポリメラーゼによりmRNAを合成し、該核酸配列の非翻訳領域または非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。レトロウイルスの場合は、RNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)により、tRNAをプライマーとしてDNA-RNAハイブリッドを合成する。その後、DNAにハイブリッドしたRNAを逆転写酵素のRNase H活性により分解し、直鎖状dsDNAを合成する。これを適当に処理した後DNA依存性RNAポリメラーゼIIによりmRNAを合成し、該核酸配列の非翻訳領域または非翻訳領域からそれに隣接する翻訳領域を含む配列またはその断片を使用することができる。

【0074】

本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列としてcDNA配列が用いられる場合、上記方法で得られたmRNAから、逆転写酵素を用いてcDNAを調製することが好ましい。また、ウイルスゲノムから例えばPCR等を利用して調製したゲノムDNA配列や、ヌクレオチド配列決定により得られた情報に基づきDNAシンセサイザー等を用いて部分的または全体的に化学合成されたDNAも好適に用いられる。

【0075】

本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列は、有用遺伝子が発現されうるように構築された発現ベクター内（好ましくはプロモーター領域の下流と有用遺伝子の上流との間）に組み込むことにより、直接的あるいは間接的に該有用遺伝子発現が増強され得るものを称し、IRES活性を有していても有していなくてもよいが、その由来となった領域がIRES活性を有していたものであることが好ましい。本発明の核酸配列を遺伝子発現ベクターに組み込んだ場合に、該IRES領域がIRES活性を有しているか否かは不明である。特に、発現増強活性に鑑み、前記したIRES領域に、少なくとも1つのピリミジンリッチ領域、特にBoxAおよびBoxBのユニットを含む核酸配列が好ましい場合がある。また、BoxBに含まれるATGまたはAUGの配列が、開始コドンとして5'非翻訳領域の最下流または翻訳領域の最上流に組み込まれてもよい。

【0076】

なお、HCVのmRNAの5'非翻訳領域の場合、BoxAは配列番号：1のヌクレオチド第191～199位に、BoxAの上流に存在するピリミジンリッチ領域は配列番号：1のヌクレオチド第40～46位および第120～130位に、そしてBoxBは配列番号：1のヌクレオチド第213～219位に認められる。

【0077】

また、本発明の核酸配列に相当しうる上記ウイルスの5'非翻訳領域の断片の例として、HCV由来の核酸配列の場合、5'非翻訳領域の前半部分（配列番号：1のヌクレオチド第1～180位）、後半部分（配列番号：1のヌクレオチド第181～341位）の各断片ともが、発現増強活性を有し、特に後半部分核酸配列の断片で強力な活性が認められることが判明した（実施例5および6参照）。

【0078】

上記5' 非翻訳領域もしくはその断片の変異体は、如上のウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域の可変領域において、置換、挿入及び／または欠失を含む変異により得られるものが好ましい。特に、核酸配列にIRES領域が含まれる場合、ピリミジンリッチ領域、特にBoxA、およびBoxBが保存された変異体が好適に利用され得る。

【0079】

さらに、本発明の有用遺伝子発現を増強する核酸配列に含まれる5' 非翻訳領域に隣接する翻訳領域の一部は、5' 非翻訳領域の5 倍数以下の塩基、好ましくは5' 非翻訳領域と同数もしくは±100塩基程度の断片を称する。例えば、HCV由来の核酸配列の場合、5' 非翻訳領域に隣接する翻訳領域はコア蛋白質であり、これをコードする領域の5' 側300塩基程度が含まれる。かかる配列の変異体も、可変領域において、置換、挿入及び／または欠失を含む変異により得られるものが好ましい。なお、HCVのmRNAの5' 非翻訳領域の場合、可変領域は配列番号：1 のヌクレオチド第1～36位および第175～270位に、高度保存領域は配列番号：1 のヌクレオチド第121～174位および271～339位に認められる。

【0080】

如上の有用遺伝子発現増強核酸配列は、発現ベクターに正方向すなわち、5' から3' 方向へと転写、翻訳が行われるように組み込まれるべきである。

【0081】

本発明の発現ベクターは、宿主細胞中 (*in vitro*および*in vivo*の双方) において、本発明の有用遺伝子発現増強活性を有する核酸配列を好ましくはプロモーター配列の下流且つ有用遺伝子配列の上流に連結させ、有用遺伝子を発現させ得るように構築された発現ベクターであれば特に限定されない。発現ベクターの構築に用いられるベクターは市販されているものであってもよい。例えば、pUC19、pTV118N (寶酒造社製)、pUEX2 (アマシャム製)、pGEX-4T、pKK233-2 (ファルマシア社製)、pMAM-neo (クロンテック社製)、pGL2 (プロメガ社製)、pDNA 3.1+ (インビトロジェン社製) 等が挙げられる。本発明の発現ベクターの構築方法は、特に限定されるものではなく常法により制限酵素、リガーゼ等を利用して行うことができる。

【0082】

本明細書で言う発現ベクターとは、プラスミド、λファージ、コスミド等のようなレプリコンに、有用遺伝子発現増強活性を有する核酸配列と有用遺伝子を組み込んで、有用遺伝子が複製・発現されるようにしたものを言い、実施例で利用したベクターに限定されない。例えば、コスミドよりもさらに長いDNA断片をクローニングできる発現ベクターとして、P1ファージ、F因子および酵母の人工染色体YAC等がある。また、λファージには置換型ベクターおよび挿入型ベクターが含まれ、これらは有用遺伝子の長さに応じて適宜選択することができる。

【0083】

また、例えば動物細胞発現可能なベクターとして公知のものに、SV40系ベクター、ウシパピローマウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、レトロウイルスベクター等がある。

【0084】

発現ベクターが形質転換またはトランスフェクトされる宿主細胞として細菌、特に大腸菌を使用する場合には、発現ベクターは普通少なくともプロモーター領域（プロモーター、オペレーターおよびシャインダルガーノ配列を含む）、開始コドン、有用遺伝子配列、終始コドン、ターミネーター領域等から構成される。酵母または動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターは、少なくともプロモーター、開始コドン、シグナルペプチド、有用遺伝子配列および終始コドンを含むことが好ましい。また、エンハンサー配列、有用遺伝子の5'-および3'-非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位および選択マーカーを発現ベクターに挿入することもできる。

【0085】

本発明の遺伝子発現ベクターに組み込まれるプロモーターとしては、従来よりよく知られているSV40(Simian Virus 40)、SRα、サイトメガロウイルスプロモーター、アクチンプロモーター、ウイルス性LTR(Long Terminal Repeat)、例えばHTLV-1 LTR、HIV-LTR、ラウス肉芽種ウイルスLTR、単純ヘルペスチロシンキナーゼウイルスプロモーター等の強力なプロモーター、弱いプロモーターに関わらず使用できる。

【0086】

遺伝子発現ベクターに組み込み、目的とするベクターのみを回収するための選択マーカーとしては、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下DHFRと略す）遺伝子（メトトレキサート耐性遺伝子）、neo遺伝子（G418耐性遺伝子）等が挙げられ、例えば、DHFR遺伝子が欠損しているCHO細胞を用いて、DHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミヂンを含まない培地によっても選択できる。また、メトトレキサートの濃度を上げて培養し、耐性細胞を選択することにより、有用遺伝子を細胞内で発現させ、さらに高発現の細胞株を得ることもできる。

【0087】

構築された発現ベクターの例は、図2～4に概略示されるとおりである（実施例2～6参照）。

【0088】

本発明は、この様に構築された遺伝子発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、例えば、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞および微生物細胞（大腸菌、枯草菌、酵母等）で、発現ベクターに組み込まれた有用遺伝子を発現することができる宿主細胞も企図するものである。好ましい宿主細胞として、プロモーター配列と有用遺伝子配列との間に組み込まれた有用遺伝子発現増強核酸配列の活性を最大限に引き出すことができる宿主細胞が選択される。

【0089】

本発明の宿主細胞たる動物細胞としては、ヒト由来の細胞が挙げられるが、本発明に使用した有用遺伝子発現増強活性を有する核酸配列がその動物細胞内において有用遺伝子の発現を増強させることができる細胞であれば特に限定されるものでない。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞等がある。また、微生物細胞としては、例えば大腸菌および枯草菌等の細菌類ならびにサッカロマイセス・セレビシエおよび麦酒酵母等の酵母類等が含まれる。また、植物細胞としては、綿植物細胞、アラビドプシス細胞等が挙げられる。

【0090】

前記の通り、有用遺伝子発現増強核酸配列はIRES活性を有することが好ましいが、ウイルスのIRESは構造的にも多様であり、その機能発現に関する宿主細胞群の要求性も異なるうえウイルス感染により局在性の変化するIRES関連分子群も存在するため、IRES領域を含む核酸配列を本発明において用いる場合にはその核酸配列に応じて宿主を適宜選択することが好ましい。

【0091】

さらに、目的の発現増強が行える適当な宿主細胞が入手できない場合には、用いる宿主細胞に形質転換等により修飾を施すことができる。例えば、宿主細胞を修飾する方法としてトランス因子（例えば、La、p25、PTB等）を宿主細胞に導入、もしくは宿主細胞内で発現することができるよう形質転換することもできる。IRESの機能発現にはキャップ依存的翻訳開始に関わる分子群の多くが動員されるが、その他のトランス因子も必要であるとされる。本明細書で言うトランス因子とは、宿主細胞由来の分子群であって、直接的もしくは間接的に本発明の有用遺伝子発現増強活性を引き出すかまたは増強させることができる分子群を示す。翻訳の開始にはRNAの高次構造の他に、IRESに作用するトランス因子が重要な役割を果たしているが、必要とされるトランス因子はIRES毎に異なり、機能発現に至る機構もIRESによって様々であることが予想される。

【0092】

前記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

【0093】

さらに、前記遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を有し、有用遺伝子産物を効率よく発現している生物（動物、植物、昆虫など）も本明細書に開示する。

【0094】

また、前記宿主細胞を培養して有用遺伝子産物を単離することによる、または

かかる宿主細胞を保有する生体内で目的とする遺伝子産物を生産する有用遺伝子産物の製造方法、有用遺伝子の発現方法、発現ベクターを利用した遺伝子発現の増強方法も本発明により企図される。

【0095】

本発明の修飾された実施態様として、新規5'非翻訳領域および／またはIRESを有する核酸配列を探索・発見する方法が包含され、この方法によって取得された配列もしくはそれらの断片、または5'非翻訳領域から翻訳領域までを含む配列もしくはその断片や、これらの変異体を有用遺伝子発現増強核酸配列として用いることもできる。

【0096】

新規5'非翻訳領域および／またはIRESを有する核酸配列を探索・発見する方法の例を以下に説明する。ポリオウイルス感染細胞内ではeIF4F (eIF4E, eIF4AおよびeIF4 γ の複合体) のサブユニットeIF4 γ (p220) が切断を受けることが知られている。このため、感染細胞内ではeIF4Fのレベルは低下する。このような状態は熱ショックによっても作り出すことができる。しかしてキャップ結合蛋白質eIF4Eの脱リン酸化が起こり、キャップ構造への親和性が低下してしまう (Lamphear, B. J. et al. ; J. Biol. Chem., 266, 2789, 1991)。このような状態では、eIF4Fの要求性が高いmRNAの翻訳は抑制され、この要求性が低いmRNAまたはIRESを有するmRNAのみが、mRNAとして機能して翻訳される。以上のような知見に基づき、熱ショック等を利用してIRES (類似) 活性を含む核酸配列を新たに発見することができる。実際に、ポリオウイルス感染細胞内でも機能しているmRNAが探索され、その配列に含まれるIRESが同定されている (Macejak, D. G. et al. ; Nature, 353, 90, 1991)。また、別の例として、5'-非翻訳領域が長く、その領域内に複数のAUG配列を持つ核酸配列を遺伝子配列バンクなどで探索する方法がある。実際に、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の発生・分化に関するmRNAにこのような配列が数多く存在することが判明し、アンテナペディヤ遺伝子 (Antp) から転写される2つのmRNA上にIRESが同定されている (Oh, S. K. et al. ; Genes Dev., 6, 1643, 1992)。このような発生・分化段階における動物細胞中では、熱ショックを受けた細胞内と同様にeIF4Eのリン酸化が十分でなく

、キャップ依存的翻訳開始機構は機能していない状態にあると考えられている (Bonneau, A. -M. et al. ; J. Biol. Chem., 262, 11134, 1987)。

【0097】

また、IRESを同定する方法として、2つのシストロンをもつmRNAを利用することができる。この方法では、IRESを有する第2シストロンの翻訳は、第1シストロンの翻訳が阻害されている条件下でも行われることを利用する。最近、EMCVの、IRESを有する環状RNAは、スパルソマイシンにより翻訳の伸長反応が阻害されている条件下でもRNAへのリボソームの結合が起こることが示されている (Chen, C. et al. ; Science, 268, 415, 1995)。

【0098】

以下、実施例に基づいて本発明をさらに説明するが、本発明の範囲はこれら実施例により限定的に解釈されるべきではなく、当業者により想到される種々の改良、修飾された態様も本発明に包含される。

【0099】

【実施例】

まず、以下の実施例において本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターの宿主細胞へのトランスフェクションの方法、トランスフェクタントの同定 (ルシフェラーゼ活性のアッセイ) について概略説明する。

【0100】

〔トランスフェクション〕

後記実施例2～6における、宿主細胞への発現ベクターのトランスフェクションはProFection Mammalian Transfection Systemsキット (Promega社製) を使用し、リン酸カルシウム法によって行った。使用した細胞系は実施例によって異なるが、トランスフェクションを行なう前日に細胞を6ウェルプレートの各ウェル (直径35mm) に、翌日使用する際にウェルの約50%の細胞濃度になるように播種した。すなわち、 5×10^5 の細胞を3mLの培地に播種して、37℃、5%CO₂ 下で一夜培養したものをを用いた。トランスフェクション実施当日に、リン酸カルシウムと発現ベクターDNAとの沈殿を細胞培養液に加える前に、上記培養細胞の培養上清を吸引して除き、新鮮な培地を加えた。培地はすべての実験に共通で、10%牛胎児血清

を添加したDMEM培地（ダルベッコ変法イーグル培地：Dulbecco's Modified Eagle Medium）（GIBCO社製）を使用した。

【0101】

リン酸カルシウムと発現ベクターDNAとの沈殿は、以下のようにして作製した。すなわち、ポリスチレンチューブを2本（AおよびB）用意し、チューブAの方にキットに付属の水、 CaCl_2 および発現ベクターDNAを混合し、チューブBの方にキットに付属の2×HEPES（50mM HEPES, pH=7.1, 280mM NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4 ）をチューブAに入っている液量と等量注入した。チューブBの中にチューブAの液を全てを混ぜながらゆっくりと滴下し、30分間室温放置すると液がうっすらと白濁してくる。これをボルテックスミキサーで良く混合した後に、1つのウェルの細胞培養液の中にチューブ中の液をすべて滴下した。この結果ウェルに投入されるDNA量は5 μg となるようにした。次いで、37℃で6時間培養後に培養上清を吸引して除き、PBS(-)（リン酸緩衝性生理食塩水（pH 7.4）：137 mM NaCl、8.10 mM Na_2HPO_4 （無水）、2.68 mM KCl、1.47 mM KH_2PO_4 ）で細胞表面を2回洗浄した。その後、新鮮な培地を加えて約48時間37℃で培養した。

【0102】

〔ルシフェラーゼ活性のアッセイ法〕

ルシフェラーゼ活性のアッセイは、pGL2 ベクターを使用した実施例2、3および4ではLuciferase Assay system（Promega社製）または、その他のベクターを使用した実施例5および6ではDual Luciferase Assay System（Promega社製）キットを用いて行った。上記のようにトランスフェクションを行った約48時間後に、キットの説明書に従って、トランスフェクション後の各ウェルの細胞よりルシフェラーゼ酵素液を得るため、キットの中のlysis bufferを1ウェル当り500 μl づつ加えて細胞中のルシフェラーゼを抽出した。

【0103】

こうして得られた酵素液につきルシフェラーゼ活性を測定した。すなわち、Luciferase Assay System（Promega社製、実施例2、3および4）またはDual Luciferase Assay System（Promega社製、実施例5および6）キットを使用し、キットの説明書に従って、100 μl のLuciferase Assay Reagent に20 μl の酵素液を

加え、ルミネッセンスリーダーBRL-301(Aloka社製) を使って各サンプルを室温で1分間測定した。

【0104】

ルシフェラーゼ活性を酵素液の蛋白質量当たりで示すために、ルシフェラーゼを測定した後の残りの酵素液中の蛋白質含量をCoomassie Plus Protein Assay Reagent (PIERCE社製)と添付の牛アルブミン標準液を用いて測定した。

【0105】

実施例2～6において、それぞれの実験はトランスフェクションの段階から二重試験または三重試験で行った。すなわち、一種類のDNAに対して2～3ウェルで、別々に宿主細胞へのトランスフェクションを行い、その各々から得られた酵素液のルシフェラーゼ活性を測定した。後掲の表1～5に示されるデータは、同じトランスフェクタント由来の酵素液の活性を2～3回測定した結果ではない。

【0106】

〔実施例1〕：HCVの核酸配列断片の作製

有用遺伝子発現増強核酸配列として、HCV5' 非翻訳領域由来のIRES領域を含むcDNA配列を調製した。HCV感染患者の血清より常法によってmRNAを抽出し、逆転写酵素 (GIBCO BRL社製) を反応させて、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型にして、IRES活性を有するHCVの5' 非翻訳領域 (配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位) とコア蛋白質翻訳領域の一部 (同、ヌクレオチド第342～713位) を含む特定の断片を増幅するため、以下の配列を有するプライマー (5' 末端側に制限酵素HindIII認識部位を付加したもの、配列番号：2～6) を用いてPCRを行った。

【0107】

5' HindHCV001 5'-CCC AAG CTT GCC AGC CCC CTG ATG GGG GCG A-3' (配列番号：2)

5' HindHCV180 5'-CCC AAG CTT CTG GCA ATT CCG GTG TAC TCA C-3' (配列番号：3)

5' HindHCV181 5'-CCC AAG CTT GAC GAC CGG GTC CTT TCT TG-3' (配列番号：4)

3' HindHCV341 5'-CCC AAG CTT GGT GCA CGG TCT ACG AGA CCT-3' (配列番号：

5)

3' HindHCV713 5'-CCC AAG CTT ATC GAT GAC CTT ACC CA-3' (配列番号: 6)

PCRは、94℃で30分間、55℃で30分間および72℃で30分間を20サイクルにて行い、しかしてHCVの5'非翻訳領域を含む断片、すなわち、配列番号: 1のヌクレオチド第1~180位、第181~341位、第1~341位、第181~713位および第1~713位の配列を有するDNA断片が得られた。これら断片を、以下、それぞれHCV 1-180、HCV181-341、HCV1-341、HCV181-713およびHCV1-713と称する。

【0108】

【実施例2】: トランジェントトランスフェクション

ベクターとしてpGL2B (=pGL2Basic、Promega社製、ホタル・ルシフェラーゼをコードするcDNA配列およびSV40 polyAシグナルを含み、プロモーター、エンハンサー、発現増強核酸配列は含まない)ならびに、pGL2C (=pGL2Control、Promega社製、ホタル・ルシフェラーゼ、SV40 polyAシグナル、SV40 初期プロモーター/エンハンサーを含み、発現増強核酸配列は含まない、図2(a)参照)を入手し、pGL2B UTR5'-3' (pGL2BのHind III部位に実施例1で得られたHCV1-341が5'-3'の方向に挿入されている、図2(b)参照)を以下のとおりに調製した。

【0109】

HindIII認識部位が付加されたPCR産物である前記HCVのcDNA断片のうちHCV1-341と、ベクターpGL2Bを、それぞれHindIIIを用いて37℃にて、一夜反応させて消化した後、分子内でのセルフライゲーションを防ぐために、アルカリフォスファターゼ (ベーリンガー・マンハイム社製) により37℃にて30分間処理を行った。DNAライゲーションキットVer.1 (TAKARA) を用いマニュアルに従って、HindIII消化後のベクターとcDNA断片とのライゲーション反応を行った。

【0110】

得られたベクターDNAをコンピテント細胞に導入し、形質転換細胞を得、コロニーの中からHCVの各断片を含む組み換え体を選択し、常法に従ってプラスミドDNAを精製した。

【0111】

トランスフェクションのため、上記3種のいずれかのベクターDNAを5μgと、

トランスフェクション用の前記キット中のCaCl₂液18.5 μ lをチューブに加え、水を加えて150 μ lとしたものを先に述べたチューブAとし、チューブBには2×HEPES 150 μ lを入れた。宿主細胞としてCOS1細胞を使用し、上記の手順に従ってトランスフェクションを行なった後、それぞれルシフェラーゼ活性を測定した。

【0112】

pGL2Bベクターはルシフェラーゼ活性を示さないので、これをトランスフェクションした細胞の酵素液をブランクとして用いた。ルシフェラーゼ活性は、蛋白質1 mg当たりの相対発光単位 (U/mg) で表した。

【0113】

こうして得られた結果を以下の表1に示す。

【0114】

【表1】

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pGL2C	1623	1616
pGL2B UTR5'-3'	60	52

【0115】

この結果から、プロモーターを含まないベクターpGL2BにHCV1-341が挿入されたベクターpGL2B UTR5'-3'でトランスフェクトされた宿主細胞のルシフェラーゼ活性は非常に低い数値であることが明らかである。従って、HCVの遺伝子の5' 非翻訳領域（配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位）自体にはプロモーターとしての活性が無いか、またはあったとしても非常に微弱であることが示された。すなわち、本発明の実施例で用いたベクターに含まれるプロモーターよりも、HCVの5' 非翻訳領域に強いプロモーターとしての強い活性があるために、見かけ上HCVの5' 非翻訳領域に遺伝子発現増強効果があるように見えてしまうという可能性が否定される。HCVはRNAウイルスであり、複製の過程にDNAに転換されることはないので遺伝子の5' 非翻訳領域にプロモーター活性を持っていなくても妥当であ

るといえる。

【0116】

実施例3：トランジェントトランスフェクション

本発明の有用遺伝子発現ベクターを構築するため、実施例2に記載のpGL2CのHind III部位にHCV1-341が5'-3'方向に挿入されたpGL2C UTR5'-3'（図2（c））を、前記pGL2B UTR5'-3'の調製法と同様にHindIIIを用いて調製した。

【0117】

pGL2CまたはpGL2C UTR5'-3'のいずれかのベクターDNAを5 μ g用い、実施例2におけると同様にしてCOS1細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

【0118】

こうして得られた結果を以下の表2に示す。

【0119】

【表2】

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pGL2C	1123	1360
pGL2C UTR5'-3'	4758	4637

【0120】

このデータは、発現ベクターの中のプロモーター配列とルシフェラーゼ遺伝子との間にHCV1-341を5'-3'の方向に挿入するとルシフェラーゼ活性が上昇することを明示している。従って、HCVの遺伝子の5'非翻訳領域に遺伝子発現増強効果があることが示唆された。

【0121】

実施例4：トランジェントトランスフェクション

実施例3のpGL2C UTR5'-3'に替えて、pGL2CのHind III部位にHCV1-341が実施

例 3 とは逆の 3'-5' 方向に挿入された pGL2C UTR3'-5' (図 1 (d) 参照) を作製し、実施例 3 と同様の実験を行った。この結果を以下の表 3 に示す。

【0122】

【表 3】

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pGL2C	177	197
pGL2C UTR3'-5'	156	96

【0123】

この結果から明らかとなおり、HCV1-341を3'-5'方向に挿入した場合実施例 3 で認められたような活性増強効果は全くなく、むしろ活性が低下していた。この結果と実施例 3 の結果を総合して、HCVの5' 非翻訳領域には、その塩基配列特異的に、そして5'-3'の方向に依存して有用遺伝子産物発現増強効果があることが示される。また、この配列は従来のエンハンサー配列ともその本質を異とすることも明らかである。

【0124】

なお、本実施例において、pGL2Cがトランスフェクトされた細胞の活性値は、実施例 2 や実施例 3 における結果に比べて1/10またはそれ以下であるが、これは本実施例でトランスフェクションの効率が実施例 2 や実施例 3 の1/10であったことによるものであり、pGL2Cとの比較においてpGL2C UTR3'-5'による効果を考察しているので、相対的な活性値の低さについては問題ないものとする。

【0125】

実施例 5 : トランジェントトランスフェクション

本発明による有用遺伝子発現増強の効果がプロモーター、有用遺伝子、宿主細胞等に特異的なものであるか否かを検討するため、本実施例では、実施例 2 ~ 4 で使用したものとは相違するプロモーターと、起源の異なるルシフェラーゼを含

むpRLTKベクター（Promega社製、HSV TK プロモーター、SV40 polyAシグナルおよびRenilla Luciferaseを含む、図3（a）参照）を用い、宿主細胞としてはヒト肝癌由来Hep G2細胞を使用した。

【0126】

実施例1において調製したHCVの5' 非翻訳領域を含むcDNA断片、HCV1-180、HCV1-341、HCV181-341またはHCV181-713をそれぞれ、いずれもpRLTKのHind III部位に実施例2に記載の手順により挿入、pRLTK 1-180（図3（b））、pRLTK 1-341（図3（d））、pRLTK 181-341（図3（c））、およびpRLTK 181-713（図3（e））を作製した。pRLTK 1-341は、実施例3におけるpGL2C UTR5'-3'と同じ発現増強核酸配列を挿入したもの、そしてpRLTK 1-180はpRLTK 1-340の前半分、pRLTK 181-341は後半分に相当する配列を挿入したものである。pRLTK 181-713はpRLTK 1-341よりも192塩基対だけ長い配列を含み、この192塩基対はコア蛋白質の翻訳領域に相当する。

【0127】

宿主細胞へのトランスフェクションにあたり、1ウェル当りに用いたDNA量は実施例2、3および4と同じく5 μ gでその他の条件も全く同一とした。

【0128】

但し、ルシフェラーゼとしては上記実施例と異なり、ホタルではなくウミシイタケ（Renilla）由来のものを用いたので、アッセイキットは先に述べたようにDual Luciferase Assay Systemを使用した。

【0129】

それぞれのベクターをトランスフェクトした宿主細胞に認められた活性を以下の表4に示す。

【0130】

【表4】

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)	No. 3 (U/mg)
pRLTK	21	65	42
pRLTK 1-341	314	125	291
pRLTK 1-180	227	175	164
pRLTK 181-341	1,035	1,036	1,111
pRLTK 181-713	482	381	491

【0131】

この結果、HCV1-180, HCV1-341, HCV181-341またはHCV181-713のいずれの配列を用いても活性増強効果が顕示され、実施例2、3および4で観察された活性増強効果が、SV40 プロモーターとホタル・ルシフェラーゼの組み合わせで、しかもCOS1細胞にトランスフェクトした場合のみに認められる特異的なものではないことを示している。さらに、pRLTK 181-341を用いた場合に特に効果が強く、HCV 1-341の核酸配列による効果は、その配列のうちヌクレオチド第181～341位に起因している可能性を示している。

【0132】

従って、本実施例によって、プロモーターや有用遺伝子の起源や種類が違って、また宿主細胞が異なっても、やはり5' 非翻訳領域(配列番号：1、ヌクレオチド第1～341位に示される配列)は遺伝子発現増強効果を有していること、この配列のうちヌクレオチド第181～341位が最も強い効果を有するので、当該配列中に本発明による効果を生み出す配列が存在することが示唆された。また、5' 非翻訳領域のみならずコア蛋白質の翻訳領域の一部(配列番号：1、ヌクレオチド第342～713位)をも含む配列を用いても発現増強の効果は認められることも明らかになった。

【0133】

実施例6：ステイブルセルライン

本実施例では、実施例2～5とは異なり、宿主細胞のトランジェントトランスフェクションによる結果ではなく、トランスフェクションの後安定に発現ベクターが組み込まれて、導入した遺伝子の発現が継続され得る系（ステイブルセルライン）における、本発明の有用遺伝子発現増強核酸配列の効果を確認した。ステイブルセルラインは、抗生物質G418（ネオマイシン）に対する耐性遺伝子neoを有する発現ベクターを使って宿主細胞をトランスフェクトし、次いでG418を含む培養液中でも増殖する細胞のみを集めることによって得ることができる。

【0134】

ベクターとしてはまず、pcDNA3.1+（Invitrogen社製）を入手し、このベクターからT7プロモーターの配列を除いたものを作製し、そのHindIII/XbaI部位に実施例5と同様のウミシイタケ・ルシフェラーゼを組み込んだプラスミドpcDNARL（図4（a））を調製した。この発現ベクターにおけるプロモーターおよびエンハンサーはCMV、polyAシグナルはウシ成長ホルモン由来のものである。

【0135】

前記HCV1-180、HCV1-341、HCV181-341、HCV181-713またはHCV1-713の各cDNA断片をpcDNARLベクターに組み込んで、それぞれプラスミドpcDNARL 1-180、pcDNARL 1-341、pcDNARL 181-341、pcDNARL 181-713またはpcDNARL 1-713を調製した。

【0136】

これら各発現プラスミドの宿主細胞へのトランスフェクションは、実施例2に記載したと同様に実施した。但し、ベクターDNAを10 μ gとCaCl₂を37 μ l、これにキットに添付の水を加えて300 μ lとしたものをチューブA液に、チューブBには2 \times HEPESを300 μ lを入れて用いた。また、宿主細胞であるHepG2細胞は、あらかじめコラーゲンをコーティングしたT75フラスコ（細胞接着面積が75cm²の培養フラスコ）に約50%の細胞密度となるように準備しておいたものを使用した（5 \times 10⁶細胞数/20mL培地）。

【0137】

実施例2～5では、トランスフェクト後の細胞を約48時間培養した後に、細胞

中のルシフェラーゼ活性を測定して結果を求めたが、本実施例では約48時間経った頃にステイブルセルラインを獲得するべくG418を培養液中に800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。37℃で培養を継続すると約1週間後にはほとんどの細胞が死滅してしまうが、上記各プラスミドDNA（耐性遺伝子neoを有する）を含む細胞は生き残り、コロニーを形成する。このコロニー群がある程度成長したら新しいフラスコに移し、37℃、5%CO₂で培養して増殖させると共に、細胞の一部を液体窒素に保存した。

【0138】

ここでは、形成されたコロニーを一つ一つ単離して増殖した訳ではなく、生き残った細胞を含む全てのコロニーの混合物として回収したので、各cDNA断片由来のステイブルセルラインは、全て同条件で得られたものといえる。

【0139】

こうして増殖した各ステイブルセルラインの6ウェルプレートの1ウェル（直径3mm）に相当する面積分の細胞から、前記の通りに酵素液を抽出してルシフェラーゼ活性を測定した。この結果をpcDNARL、pcDNARL 1-341（図4（c）参照）およびpcDNARL 181-341（図4（b）参照）につき以下の表5に示す。

【0140】

【表5】

ベクター	No. 1 (U/mg)	No. 2 (U/mg)
pcDNARL	69,593	66,062
pcDNARL 1-341	89,987	86,442
pcDNARL 181-341	198,413	201,365

【0141】

この結果、ステイブルセルラインでも実施例5と同様にHCV181-341のcDNA配列により活性が最も増強されることが示された。また、この実験で使用されたプロ

モーターは実施例 2～5 で用いたプロモーターとは別のものであるが、やはり遺伝子発現増強効果は示され、本発明による効果が特定のプロモーターに依存するものでないことが明らかになった。

【0142】

従って、永久発現細胞においても、トランジェント系の結果に示された有用遺伝子発現増強効果は顕示されたので、実施例 2～4 において、比較されたグループ間によってルシフェラーゼを発現している細胞数が違うために、発現活性に差があるかのごとく見受けられたのではないかという疑問が解決された。

【0143】

【発明の効果】

本発明によって発現ベクターの種類、これに含まれるプロモーターやシグナル、エンハンサー等の配列、有用遺伝子の種類や起源、宿主細胞種の如何に関わらず、in vivoおよびin vitroでの遺伝子の発現を増強して遺伝子産物の生産量を増加させることができるという効果がもたらされる。

【0144】

この効果は、細胞培養系においてペプチド産生量を増加させる目的に利用され得るだけでなく、従来、臓器や腫瘍などに特異的であるがその活性が弱いために実用化が難しかったプロモーターと組み合わせることによって、効果的な遺伝子治療用のベクターへの応用にも利用することができる。

【0145】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

<120> Nucleic Acid Sequence which Enhances Gene Expression and Method of Enhancing Gene Expression

<130> 98PA0274

<160> 6

<210> 1

<211> 713

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<221> 5' UTR

<222> (1)..(341)

<220>

<221> CDS

<222> (342)..(713)

<400> 1

```

gccagccccc tgatgggggc gacactccac catagatcac tccccgtga ggaactactg      60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgcgtgcag cctccaggac      120
ccccctccc gggagagcca tagtgggtctg cggaaccggt gactacaccg gaattgccag      180
gacgaccggg tcctttcttg gatcaaccgg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc      240
gcgagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgttact gcctgatagg      300
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac c atg agc aca aat cct      356
                                     Met Ser Thr Asn Pro
                                     1             5

aaa cct caa aga aaa acc aaa cgt aac acc aac cgc cgc cca cag gac      404
Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
                10                15                20

gtc aag ttc ccg ggc ggt ggt cag atc gtt ggt gga gtt tac ctg ttg      452
Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu
                25                30                35

ccg cgc agg ggc ccc agg ttg ggt gtg cgc gcg act agg aag act tcc      500
Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser
                40                45                50

gag cgg tcg caa cct cgt gga agg cga caa cct atc ccc aag gct cgc      548

```

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg
 55 60 65
 cgg ccc gag ggc agg acc tgg gct cag ccc ggg tat cct tgg ccc ctc 596
 Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu
 70 75 80 85
 tat ggc aac gag ggc atg ggg tgg gca gga tgg ctc ctg tcg ccc cgc 644
 Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg
 90 95 100
 ggc tcc cgg cct agt tgg ggc cct tcg gac ccc cgg cgt agg tcg cgt 692
 Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Ser Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg
 105 110 115
 aat ttg ggt aag gtc atc gat 713
 Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp

120

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV
 cDNA

<400> 2

cccaagcttg ccagccccct gatgggggacg a 31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV

cDNA

<400> 3

cccaagcttc tggcaattcc ggtgtactca c

31

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV

cDNA

<400> 4

cccaagcttg acgaccgggt cctttcttg

29

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV

cDNA

<400> 5

cccaagcttg gtgcacggtc tacgagacct

30

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Hepatitis Type C Virus (HCV)

<220>

<223> Nucleotide Sequence of PCR Primer for Amplifying Fragments of HCV

cDNA

<400> 6

cccaagctta tcgatgacct taccca

26

【図面の簡単な説明】

【図 1】

HCVのIRES構造の概略を示す模式図である。

【図 2】

本発明の一実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

【図 3】

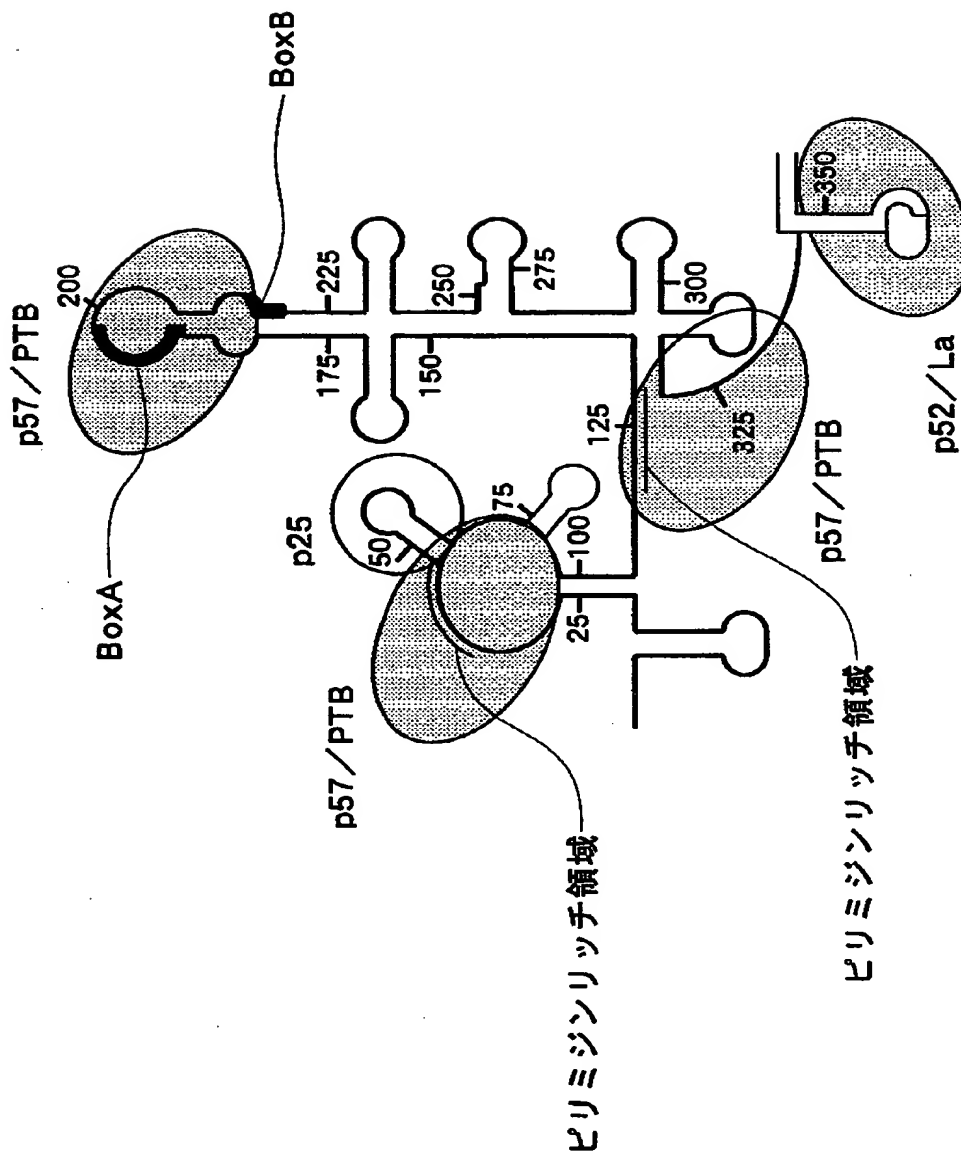
本発明の別の実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

【図 4】

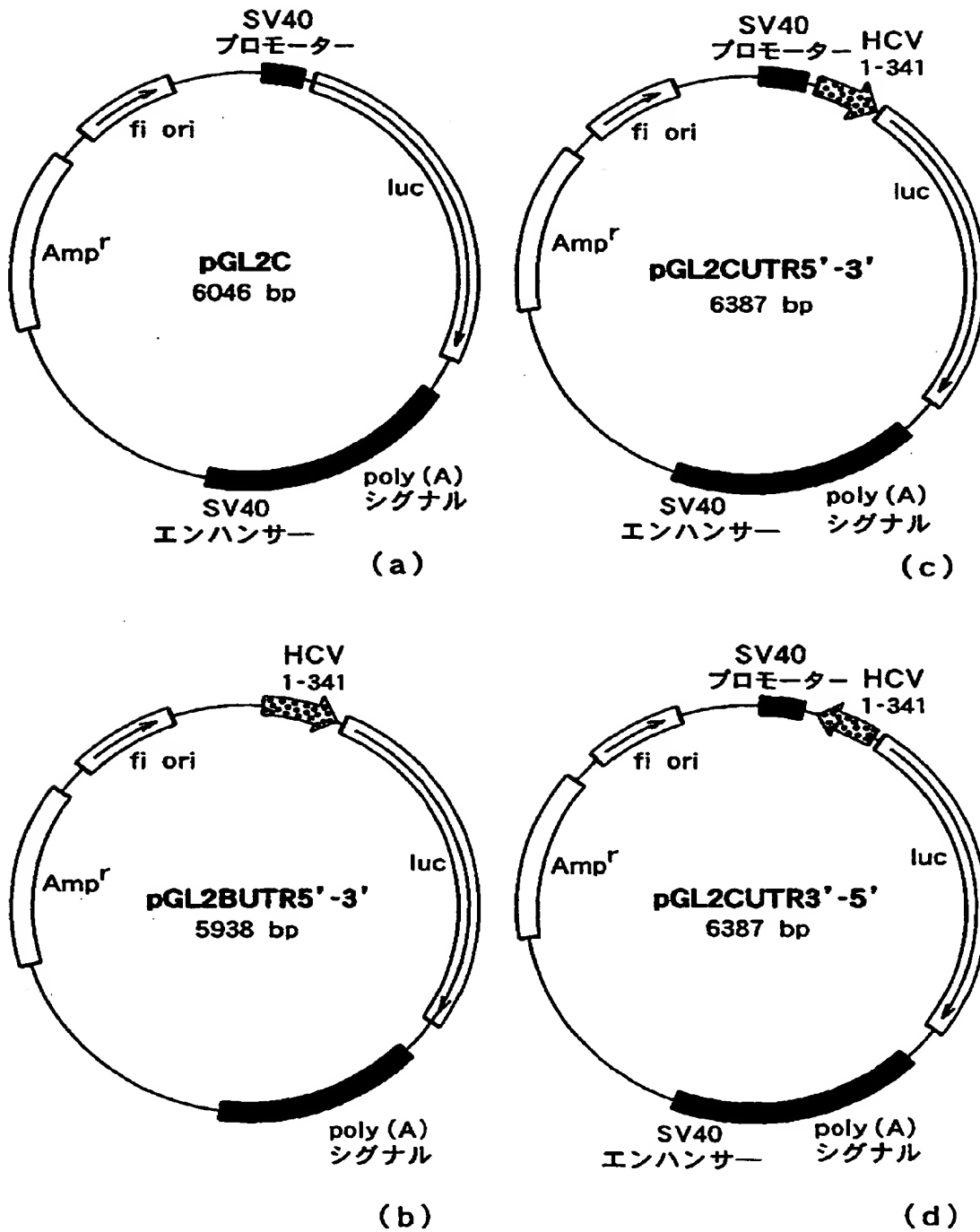
本発明のさらに別の実施態様である、有用遺伝子発現増強核酸配列を含む発現ベクターを示す模式図である。

【書類名】 図面

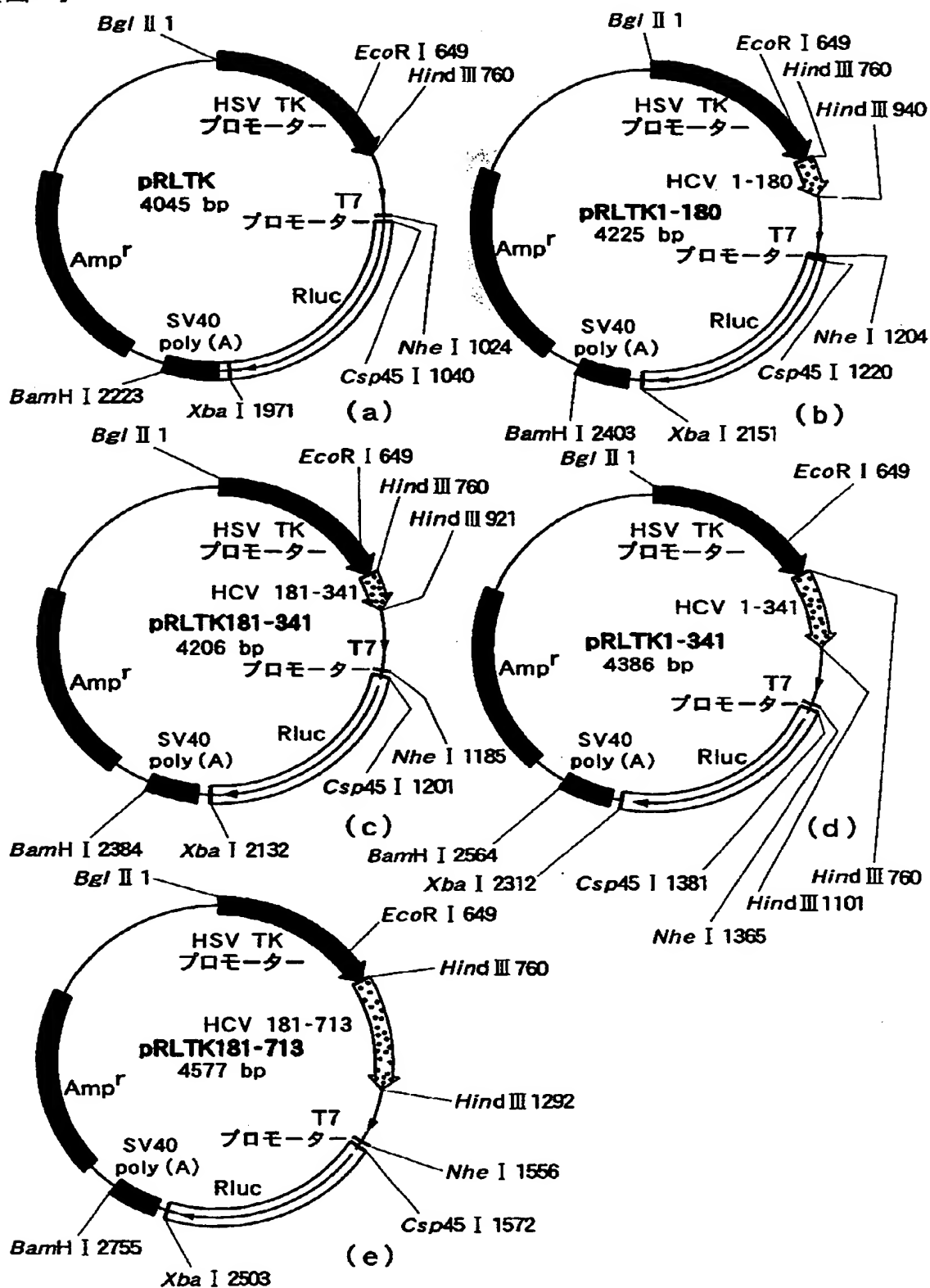
【図 1】



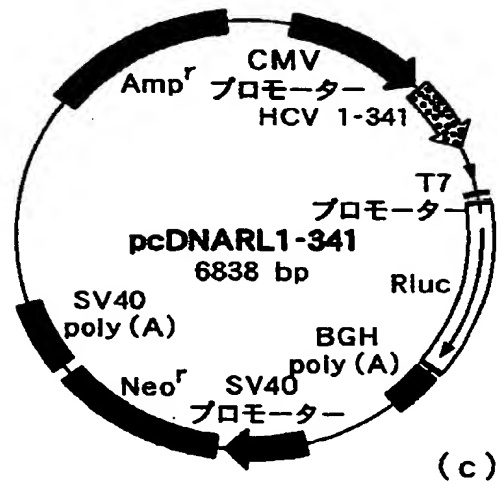
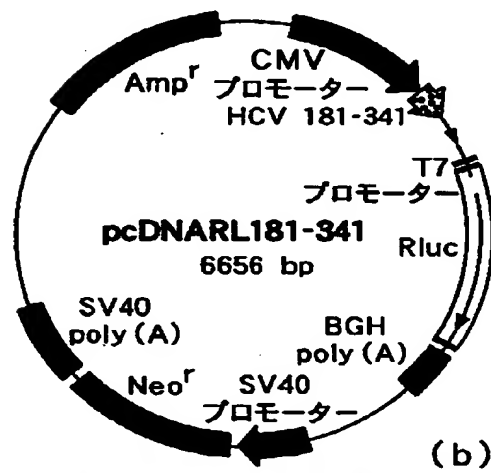
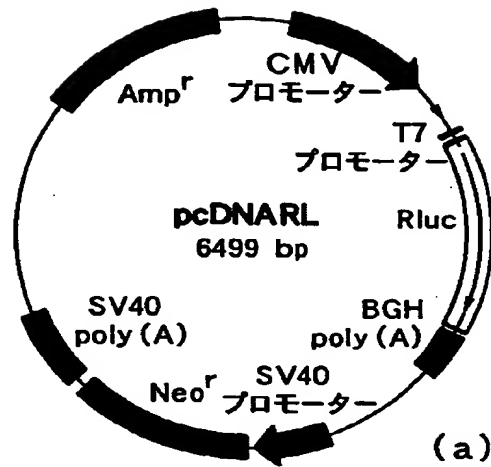
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝子の発現を増強して遺伝子産物の生産量を増加させることができる核酸配列、当該核酸配列を含むベクター、当該ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞、ならびに当該ベクターを用いた有用遺伝子産物の製造方法、および有用遺伝子の発現を当該ベクターを用いて増強させる方法を提供する。

【解決手段】 有用遺伝子の発現を増強するために、ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域もしくはその断片またはその変異体が有する配列を含む核酸配列を用いる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000238201

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100065868

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル
3階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 角田 嘉宏

【選任した代理人】

【識別番号】 100088960

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3
階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 高石 ▲さとり▼

【選任した代理人】

【識別番号】 100106242

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル
3階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 古川 安航

【選任した代理人】

【識別番号】 100107940

【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル
3階 有古特許事務所

【氏名又は名称】 岡 憲吾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000238201]

1. 変更年月日 1990年 8月 8日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

氏 名 扶桑薬品工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)